

明細書

FRETを利用した蛍光指示薬

技術分野

本発明は、蛍光共鳴エネルギートランスファー（FRET）を利用した分子間の相互作用を分析するための蛍光指示薬、並びにその利用に関する。より詳細には、本発明は、実質的に同一の蛍光特性を有する2分子の蛍光分子が標的配列を介して結合した蛍光指示薬と、分析物質とを相互作用させることにより生じるFRETを偏光解消に基づいて測定することを特徴とする分子間の相互作用を分析する方法に関する。

背景技術

生物学的系の蛍光分析法は、他の生物学的手法と比較して非侵襲的に行うことができる点で有利である。蛍光分析法の物理的手法の開発と共に、例えば細胞内での反応のモニターとして用いられる生物学的レポーター構築物が開発されてきた。特に、固有蛍光に補助因子を必要としない蛍光タンパク質を開発できれば、このタンパク質を遺伝子構築物を介して細胞中に導入して、発現させることにより各種の分析を行うことができる。蛍光蛋白質としては、特に *Aequorea victoria* 由来の緑色蛍光蛋白質（GFP）が公知である。Miyawaki 他（1997）*Nature*, 388, 882-887 には、GFPに基づいた Ca^{2+} 感知系が記載されている。

生物学的系の検討（特に、分子間の相互作用の検討など）を目的とするFRETに基づく方法の例は、Miyawaki 他（1997）*Nature*, 388, 882-887 に記載されている。しかしながら、従来の蛍光分子を利用したFRETは、何れも異なる色（スペクトル）を有する2種類の蛍光分子を利用するものである。この方法では、一つのFRET観測で、可視領域のかなりの部分を使用することになり、例えば、他の色の蛍光色素の同時観測が制限されるという問題があった。

発明の開示

本発明は、標的蛋白質と分析物質との相互作用を簡単かつ視覚的に検出することを可能にする蛍光指示薬、並びに該蛍光指示薬の利用方法を提供することを解決すべき課題とした。より詳細には、本発明は、ストークスシフトの小さい蛍光分子を利用して、ホモ FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）に基づいた蛍光指示薬を提供し、分子間相互作用の可視化システムを開発することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる分析物質の標的配列の N 末端側と C 末端側に実質的に同一の蛍光特性を有する蛍光分子成分を結合させた蛍光指示薬を用いることによって、分析物質を検出及び測定できることを見出した。本発明はこの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列の N 末端側と C 末端側に実質的に同一の蛍光特性を有する蛍光分子成分を結合させた蛍光指示薬が提供される。

本発明によれば、好ましくは、
分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列；
標的配列に共有的に結合したドナー蛍光分子成分；及び、
標的配列に共有的に結合したアクセプター蛍光分子成分；
を含む蛍光指示薬であって；

ドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子が実質的に同一の蛍光特性を有する分子であり、分析物質の結合により標的配列中に立体構造の変化が生じ、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、ある偏光特性を有した照射光によって励起した場合に観察される蛍光の偏光特性が照射光のものと異なる傾向が強くなる（偏光解消）、蛍光指示薬が提供される。

好ましくは、蛍光分子成分は蛍光蛋白質又はその変異体である。

好ましくは、蛍光分子成分は黄色蛍光蛋白質またはその変異体である。

好ましくは、蛍光分子成分は蛍光蛋白質 Venus である。

好ましくは、蛍光指示薬がさらに標的ペプチド成分とリンカー成分を含み、分析物質の標的配列が標的ペプチド成分を結合するためのペプチド結合ドメインをさらに含み、

リンカー成分が分析物質の標的配列と標的ペプチド成分とを共有的に結合し、標的配列と標的ペプチド成分がアクセプター蛍光分子成分又はドナー蛍光分子成分の何れかに共有的に結合し、

標的配列に結合した分析物質が標的ペプチド成分及びペプチド結合ドメインの相対的位置又は方向の変化を誘導し、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、これによりある偏光特性を有した照射光によって励起した場合に観察される蛍光の偏光特性が照射光のものと異なる傾向が強くなる（偏光解消）、蛍光指示薬が提供される。

好ましくは、標的配列は、カルモジュリン、cGMP 依存性蛋白質キナーゼ、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体のリガンド結合ドメイン、蛋白質キナーゼ C、イノシトール-1, 4, 5-トリホスフェート受容体、又はレコベリンである。

好ましくは、分析物質の標的配列はカルモジュリンである。

好ましくは、標的ペプチド成分は、骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCKp)、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK)、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII)、カルデスモン、カルスペルミン、ホスホフルクトキナーゼ、カルシネウリン、ホスホリラーゼキナーゼ、Ca²⁺ATP アーゼ、59 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、60 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、ニトリックオキシドシンターゼ、I 型アデニリルシクラーゼ、Bordetella pertussis アデニリルシクラーゼ、ニューロモジュリン、スペクトリン、ミリストイル化アラニンリッチ C キナーゼ基質 (MARCKS)、MacMARCKS (F52)、b-Adducin、ヒートショック蛋白質 HSP90a、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテイン 160 (HIV-1 gp160)、ブラッシュボーダーミオシン重鎖-I (BBMHBI)、希ミオシン重鎖 (MHC)、マストパラン、メリチン、グルカ

ゴン、セクレチン、血管作動性腸ペプチド (VIP)、ガストリン阻害ペプチド (GIP)、又はカルモジュリン結合ペプチド-2 (Model ペプチド CBP2)のカルモジュリン結合ドメインである。

好ましくは、リンカー成分はペプチド成分である。

好ましくは、リンカー成分は1から30アミノ酸残基である。

好ましくは、分析物質が作用して指示薬の立体構造を変化させる分析物質の標的配列は、酵素により切断されるアミノ酸配列である。

好ましくは、本発明の蛍光指示薬は、シングルポリペプチドである。

好ましくは、本発明の蛍光指示薬は、さらに局在化配列を含む。

好ましくは、局在化配列は核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、ゴルジ体局在化配列、又は細胞膜局在化配列である。

本発明の別の側面によれば、試料中の分析物質を検出又は測定する方法であって、

- (1) 試料と本発明の蛍光指示薬とを接触させる工程；
 - (2) ドナー成分を励起させる工程；及び
 - (3) 試料中の分析物質の濃度や活性に対応した試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を測定する工程；
- を含む方法が提供される。

好ましくは、試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を、偏光解消を測定することにより測定する。

好ましくは、蛍光異方性を求めることにより偏光解消を測定する。

好ましくは、試料が生細胞であり、接触工程が蛍光指示薬を細胞中に取り込ませることを含む。

好ましくは、細胞へ蛍光指示薬を取り込ませる工程が、蛍光指示薬の発現をコードする核酸配列に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることを含む。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛍光指示薬をコードする核酸、当該核酸を含む発現ベクター、並びに当該核酸又は発現ベクターを有する形質転換体が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の蛍光指示薬である W-cameleon 及び W-SCAT の構造を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の蛍光指示薬は、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列のN末端側とC末端側に実質的に同一の蛍光特性を有する蛍光分子成分を結合させたものである。より具体的には、本発明の蛍光指示薬は、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列；

標的配列に共有的に結合したドナー蛍光分子成分；及び、

標的配列に共有的に結合したアクセプター蛍光分子成分；

を含むものであり、

ドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子が実質的に同一の蛍光特性を有する分子であり、分析物質の結合により標的配列中に立体構造の変化が生じ、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、ある偏光特性を有した照射光によって励起した場合に観察される蛍光の偏光特性が照射光のものと異なる傾向が強くなる（偏光解消）ことを特徴とするものである。

蛍光分子を、垂直方向で偏光した光で励起する場合、蛍光分子の発色団が励起された後、この蛍光分子が回転する前に、蛍光放出が完了するために、通常は、垂直方向に偏光した蛍光が検出される。しかし、この蛍光分子の近くに同じ蛍光分子が存在すると、FRETが生じ、観測される蛍光の偏光解消が生じる。このように同じ蛍光分子の間で起こるFRET（ホモトランスファー）は、偏光解消法で測定することができる。ホモトランスファーFRETが実現するためには、蛍光分子の励

起と蛍光スペクトルに重なりがあること（ストークスシフトが小さいこと）が必要であり、GFP変異体であるCFP、YFP又はRFPなどが適している。

本発明では、標的配列としてプロテアーゼの基質部位又は Ca^{2+} によって構造変化を起こすドメインのN末端とC末端に同じ蛍光分子を結合させたものを作製し、蛍光指示薬を作製した。このような蛍光指示薬を用いることにより、アポトーシスに伴うカスパーゼ3の活性、又は細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化をモニターすることが可能になる。

本発明における蛍光分子とは、適当な電磁線で励起した際に発光することができる任意の分子を意味する。蛍光分子としては、例えば、蛍光蛋白質を使用することができる。

本発明では、ドナー蛍光分子成分とアクセプター蛍光分子成分は、実質的に同一の蛍光特性を有するものであり、好ましくは、両者は同一の蛍光分である。本発明で用いる蛍光分子は、FRETの効率の点から選択することが好ましく、FRETの効率は本明細書に記載並びに当業者に周知の技術に従って試験することができる。

「共有的に結合」とは、共有結合又は2分子間の他の共有的連結を意味する。共有的な連結としては、2分子を連結する二価成分が挙げられる。

「標的配列」とは、分析物質と結合できるアミノ酸配列を意味する。好ましい標的配列は、分析物質と結合すると立体構造が変化する。「標的ペプチド」は標的配列と結合できるペプチドを意味する。標的ペプチドは、標的配列と結合するペプチドの部分配列である。

「分析物質」は、標的配列に結合する溶液中の分子又はイオンを意味し、標的配列の立体構造を変化させるものである。分析物質は標的配列に可逆的に結合しても非可逆的に結合してもよい。

「成分」とは、指示薬の他の基に連結している分子の基を意味する。即ち、「蛍光分子成分」は、標的配列成分またはリンカー成分に結合している蛍光分子の基である。「標的配列成分」は、蛍光分子成分に結合している標的配列の基である。

「標的ペプチド成分」は、標的配列の標的ペプチドの基である。「リンカー成分」は、ドナー及びアクセプター蛍光分子成分の両方に結合している分子リンカーの基を意味する。

「作動的に連結」とは、対象成分が機能するような関係に位置していることを意味する。コード配列に作動的に連結した調節配列は、コード配列の発現が調節配列に適合した条件下で達成されるように連結している。「調節配列」は、それが連結しているコード配列及び非コード配列の発現に必要なポリヌクレオチドを意味する。調節配列としては、プロモーター、リボソーム結合部位、転写終結配列などが挙げられる。調節配列はさらに、リーダー配列及び融合蛋白質の相手側の配列などを含んでいてもよい。

「ポリヌクレオチド」は、長さが少なくとも10ヌクレオチド以上を意味する。ヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、又はそれらの改変体でもよく、一本鎖でも二本鎖でもよい。

分析物質を検出又は測定するために蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用する本発明の蛍光指示薬は、ドナー蛍光分子成分とアクセプター蛍光分子成分となる放射及び励起スペクトルを有する2分子の蛍光分子成分を含む。本発明で用いるドナー蛍光分子成分及びアクセプター蛍光分子成分は、実質的に同一の蛍光特性を有する成分であり、好ましくは同一の成分である。また、アクセプター蛍光分子成分の励起スペクトルがドナー蛍光分子成分の放射スペクトルと重複するように選択する。ドナー及びアクセプター蛍光分子成分（本発明では、これらは実質的に同一の蛍光特性を有する）は、分析物質の結合により立体構造が変化する標的配列成分に結合している。立体構造の変化によりドナー及びアクセプター蛍光分子の相対的位置及び方向が変化し、これにより、偏光解消が生じる。

蛍光分子成分は標的配列成分のアミノ末端及びカルボキシ末端に共有的に結合していることが好ましい。これにより、ドナー蛍光分子成分及びアクセプター蛍光分子成分は、分析物質が結合した際に互いに密接に移動できる。あるいは、ドナー及びアクセプター成分は、分析物質の結合の際に互いに離れるように移動し

てもよい。一例としては、アクセプター成分は、標的配列成分に結合している標的ペプチド成分に共有的に結合し、標的ペプチド成分はリンカー成分を介して標的配列成分に共有的に結合している。リンカー成分はフレキシブルなもので、標的ペプチド成分が標的配列成分に結合することができる。ドナー成分は、ドナー成分の励起スペクトル内の適当な強さの光によって励起される。ドナー成分は吸収したエネルギーを蛍光として放出する。アクセプター蛍光分子成分が励起状態のドナー成分を消光できる位置に存在する場合、蛍光エネルギーはアクセプター成分に転移されて、蛍光が放出される。

本発明では、1種類の蛍光分子（即ち、実質的に同一の蛍光特性を有する蛍光分子）を用いて FRET を起こす（本明細書では、ホモ FRET とも言う）。ホモ FRET の観察は、一般的には、蛍光の偏光解消を測定することにより行うことができる。蛍光の偏光解消を起こす要因としては、蛍光の再吸収、FRET、及び蛍光分子の回転ブラウン運動がある。しかし、一番自由度が高いと考えられる細胞質内環境においてさえ、GFP などの蛍光蛋白質の回転緩和時間は $30 \sim 40 \text{ nsec}$ と測定されており、これは GFP の蛍光の寿命（ $3 \sim 4 \text{ nsec}$ ）と比べて非常に長いいため、蛍光分子の発色団自身が偏光を解消するほど高速に回転する可能性は極めて低い。また、GFP が十分に希釈された条件下または細胞内のように光路長が極めて短い状況下では蛍光の再吸収による影響はまず起きないものと考えられる。従って、蛍光分子からの蛍光に偏光の解消が認められた場合には、FRET が生じたものと結論付けることができる。

偏光の強さは、蛍光の異方性を用いて評価することができる。蛍光の異方性（Anisotropy; A ）は、以下の式により求めることができる。

$$A = [I(\text{平行}) - I(\text{垂直})] / [I(\text{平行}) + 2 \times I(\text{垂直})]$$

式中、 $I(\text{平行})$ は入射光の偏光方向と平行な蛍光成分ベクトルを示し、 $I(\text{垂直})$ は入射光の偏光方向と垂直な蛍光成分ベクトルを示す。

試料中の蛍光は、蛍光偏光度測定装置を用いて測定できる。通常、励起源からの励起線は励起光学系を通過する。励起光学系により励起線は試料を励起する。

これに応答して、試料中の蛍光分子は、励起波長とは異なる波長を有する放射線を放出する。次いで、回収光学系が試料からの放射線を回収する。このデバイスには、スキャン中の試料を一定の温度に維持するための温度調節器を有している。一例としては、多軸転換ステージにより、複数の試料を保持するマイクロタイタープレートが移動する。多軸転換ステージ、温度調節器、自動焦点機能、並びに画像化とデータ収集に関連した電子装置は、適当にプログラムされたデジタルコンピュータによって管理されている。

偏光解消によるホモトランスファーFRETの検出は、インビトロ（キュベットやプレート内）やインビボ（顕微鏡下、細胞内）で行えるようなシステム（光学系の偏光成分を重視したもの）をセットアップすることができる。

蛍光偏光度の測定は、例えば、蛍光偏光度測定装置BEACON（TAKARA）などの市販の装置を用いて行うことができる。また、蛍光偏光度の測定方法は当業者に既知であり、例えば、蛋白質・核酸・酵素、42巻、No. 1、p 77-81（1997）などに記載されている。

本発明では任意の蛍光分子を使用できる。例えば、刺胞動物の緑色蛍光蛋白質（GFP）及びその変異体を使用することができる。変異体としては、シアン蛍光蛋白質（CFP）、黄色蛍光蛋白質（YFP）、赤色蛍光蛋白質（RFP）または青色蛍光蛋白質（BFP）などが挙げられる。これらの蛍光蛋白質は、Pacific Northwest jellyfish、Aequorea victoria、the sea pansy、Renilla reniformis、及び Phialidium gregarium などから得られる（Ward, W. W., 他, Photochem. Photobiol., 35:803-808 (1982); and Levine, L. D., 他, Comp. Biochem. Physiol., 72B:77-85 (1982)）。あるいは、フルオレセイン、ローダミン、Alexa、Cyなどの低分子有機化合物を使用することができる。

有用な励起及び放射スペクトルを有する各種クラゲ由来蛍光蛋白質は、オワンクラゲ由来の天然 GFP のアミノ酸配列を改変することによって作製されている（Prasher, D. C., 他, Gene, 111:229-233 (1992); Heim, R., 他, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:12501-04 (1994); 米国特許出願番号 08/337,915; 国際出願

PCT/US95/14692;及び米国特許出願番号 No. 08/706, 408)。GFP の cDNA は、これら他の蛋白質をコードする cDNA と連結してもよく、得られる融合体も蛍光で相手の蛋白質の生化学的特徴を保持している場合がある (Cubitt, A. B., 他、Trends Biochem. Sci. 20:448-455 (1995))。また、変異誘発により励起又は発光波長がシフトした GFP 変異体が作製されている (Heim, R. & Tsien, R. Y. Current Biol. 6:178-182 (1996))。野生型クラゲ由来の蛍光蛋白質のアミノ酸配列と 85% 以上の相同性を有する 150 の連続するアミノ酸が含まれていれば、その蛋白質は、クラゲ由来の蛍光蛋白質である。

本明細書で言う、緑色蛍光蛋白質 (GFP)、黄色蛍光蛋白質 (YFP) またはそれらの変異体とは、各々公知の緑色蛍光蛋白質と黄色蛍光蛋白質だけでなく、それらの変異体の全てを包含する意味である。例えば、緑色蛍光蛋白質遺伝子は単離され配列も決定されている (Prasher, D.C. ら (1992), “Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein”, Gene 111: 229-233)。その他の蛍光蛋白質又はその変異体のアミノ酸配列も多数報告されており、例えば、Roger Y. Tsien, Annu. Rev. Biochem. 1998. 67:509-44、並びにその引用文献に記載されている。

緑色蛍光蛋白質 (GFP)、黄色蛍光蛋白質 (YFP) またはそれらの変異体としては、例えば、オワンクラゲ (例えば、*エクオレア・ビクトリア* (*Aequorea victoria*)) 由来のものを使用できる。

GFP、YFP とそれらの変異体の一例を以下に示す。なお、F99S という表示は、99 番目のアミノ酸残基が F から S に置換していることを示し、他のアミノ酸置換についても同様の表示に従って示す。

野生型 GFP ;

F99S, M153T, V163A のアミノ酸変異を有する GFP ;

S65T のアミノ酸変異を有する GFP ;

F64L, S65T のアミノ酸変異を有する GFP ;

S65T, S72A, N149K, M153T, I167T のアミノ酸変異を有

する GFP ;

S 2 0 2 F, T 2 0 3 I のアミノ酸変異を有する GFP ;

T 2 0 3 I, S 7 2 A, Y 1 4 5 F のアミノ酸変異を有する GFP ;

S 6 5 G, S 7 2 A, T 2 0 3 F のアミノ酸変異を有する GFP (YFP) ;

S 6 5 G, S 7 2 A, T 2 0 3 H のアミノ酸変異を有する GFP (YFP) ;

S 6 5 G, V 6 8 L, Q 6 9 K, S 7 2 A, T 2 0 3 Y のアミノ酸変異を有する GFP (EYFP-V 6 8 L, Q 6 9 K) ;

S 6 5 G, S 7 2 A, T 2 0 3 Y のアミノ酸変異を有する GFP (EYFP) ;

S 6 5 G, S 7 2 A, K 7 9 R, T 2 0 3 Y のアミノ酸変異を有する GFP (YFP) ;

本発明では GFP 変異体である CFP、YFP、RFP 又はそれらの変異体を使用することが好ましく、例えば、YFP 変異体である Venus を用いることができる。Venus については、Nagai, T. 他(2002) Nature Biotechnology 20, 87-90 を参照できる。Venus は、YFP の 46 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換することにより得られる蛍光蛋白質であり、従来の GFP と比較して、大腸菌内で 30~100 倍、ほ乳類の細胞内で 3~100 倍の明るさを達成し、通常の装置でも十分検出可能な蛍光を提供することができる。

本発明で利用できる他の蛍光分子としては、Vibrio fischeri 株 Y-1 由来の黄色蛍光蛋白質、Peridinin-chlorophyll (dinoflagellate Symbiodinium sp. 由来蛋白質)、Synechococcus などの海洋シアノバクテリア由来の phycobili 蛋白質(例えば、フィコエリスリン及びフィコシアニンなど)、又はフィコエリスロビリンで再構築したオート麦由来のオートフィトクロムなどが挙げられる。これらの蛍光蛋白質は Baldwin, T. O., 他, Biochemistry 29:5509-5515 (1990), Morris, B. J., 他, Plant Molecular Biology, 24:673-677 (1994), 及び Wilbanks, S. M., 他, J. Biol. Chem. 268:1226-1235 (1993), 及び Li 他, Biochemistry 34:7923-7930 (1995) などに記載されている。

ドナー及びアクセプター蛍光分子成分間の FRET の効率は、2 つの蛍光分子が相

互作用する能力を調節することによって調節することができる。標的配列成分、標的ペプチド成分及びリンカ成分の性質も FRET 及び分析物質に対する指示薬の応答に影響する。通常、大きな立体構造変化が標的配列成分に生じることが望ましい。

標的配列成分は、分析物質の結合に際して立体構造が変化する蛋白質又はその一部である。そのような蛋白質の例としては、カルモジュリン(CaM)、cGMP-依存性蛋白質キナーゼ、ステロイドホルモン受容体（又はそのリガンド結合ドメイン）、プロテインキナーゼC、イノシトール-1,4,5-トリホスフェート受容体、又はレコベリンなどが挙げられる（例えば、Katzenellenbogen, J. A. & Katzenellenbogen, B. S. *Chemistry & Biology* 3:529-536 (1996), 及び Ames, J. B., 他, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:432-438 (1996)を参照）。標的配列成分は好ましくは、分析物質以外に標的ペプチドにも結合する。

標的ペプチド成分は表1の任意のアミノ酸配列またはその一部を含むことができる。但し、標的ペプチドは標的配列成分に結合できなくてはならない。標的ペプチドは、カルモジュリン結合ドメインの部分配列でもよい。表1に挙げた標的ペプチド成分は標的配列成分 CaM によって認識される（例えば、Crivici, A. & Ikura, M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:84-116 (1995)を参照）。標的ペプチド成分を改変して、分析物質に対する蛍光指示薬の応答を増強してもよい。他の標的配列に対する他の標的ペプチド成分も当業者には既知である。

表 1

標的	配列
SkMLCK (M13)	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (配列番号 1)
smMLCK (smMLCKp)	ARRKWQKTGHAVRAIGRLSS (配列番号 2)
CaMKII	ARRKLKGAILTTMLATRNFS (配列番号 3)
Caldesmon	GVRNIKSMWEKGNVFSS (配列番号 4)
Calispermin	ARRKLKAAVKAVVASSRLGS (配列番号 5)

PFK (M11)	FMNNWEVYKLLAHIRPPAPKSGSYTV (配列番号 6)
Calcineurin	ARKEVIRNKIRAIGKMARVFSVLR (配列番号 7)
PhK (PhK5)	LRRLLIDAYAFRIYGHVVKKGQQQNRG (配列番号 8)
(PhK13)	RGKFKVICLTVLASVRIYYQYRRVKPG (配列番号 9)
Ca ²⁺ -ATPase (C28W)	LRRGQILWFRGLNRIQTQIKVVNAFSSS (配列番号 10)
59-kDa PDE	RRKHLQRPIFRLRCLVKQLEK (配列番号 11)
60-kDa PDE	TEKMWQRLKGILRCLVKQLEK (配列番号 12)
NOS (NO-30)	KRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ (配列番号 13)
Type I AC (AC-28)	IKPAKRMKFKTVCYLLVQLMHCCKMFKA (配列番号 14)
Borderella perussis AC	IDLLWKIARAGARSAVGTEA (配列番号 15)
Neuromodulin	KAHKAATKIQASFRGHITRKKLKGEKK (配列番号 16)
Spectrin	KTASPWKSARLMVHTVATFNSIKE (配列番号 17)
MARCKS	KKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKSKK (配列番号 18)
F52 or MacMARKS	KKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK (配列番号 19)
β -Adducin	KQQKEKTRWLNTPNTYL RVNVADEVQRNMGS (配列番号 20)
HSP90a	KDQVANSASFQERLRKHGLEVI (配列番号 21)
HIV-1 gp160	YHRLRDL LLIVKRIVELLGRR (配列番号 22)
BBMHBI	QQLATLIQKTYRGWRCRTHYQLM (配列番号 23)
Dilute MHC	RAACIRIQKTIRGWLLRKRYLCMQ (配列番号 24)
Mastoparan	INLKAALAKKIL (配列番号 25)
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (配列番号 26)
Glucagon	HSQGTFTTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (配列番号 27)
Secretin	HSDGTFTSELSRLRDSARLQRLQLV (配列番号 28)
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN (配列番号 29)
GIP	YADGTFISDYSAIMNKIRQQDFVNWLLAQQQKS (配列番号 30)
Model ペプチド CBP2	KLWKKLLKLLKLLKLG (配列番号 31)

略号の説明

AC, アデニリルシクラーゼ;

BBMHCI, brush-border ミオシン重鎖-I;

CaMKII, カルモジュリンキナーゼ II;

CBP2, カルモジュリン結合ペプチド-2;

GIP, ガストリン阻害ペプチド;

HIV-1 gp160, ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖蛋白質 160;

HSP, ヒートショック蛋白質;

MARCKS, ミリスチル化アラニンリッチ C キナーゼ基質;

MHC, ミオシン重鎖;

NOS, ニトリックオキシドシンターゼ;

PDE, ホスホジエステラーゼ;

PFK, ホスホフルクトキナーゼ

PhK, ホスホリラーゼキナーゼ;

sk-, smMLCK, 骨格筋及び平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ;

VIP, 血管作動性腸ペプチド

リンカー成分の長さは、FRET 及び、分析物質の結合により立体構造変化の速度及び特異性を最適化するように選択する。リンカー成分は、標的配列成分と標的ペプチド成分とが自由に相互作用して分析物質濃度に応答できるような長さで柔軟さを有することが好ましい。FRET 効果を最適化するために、ドナー及びアクセプター蛍光分子成分の平均距離は、好ましくは約 1 nm から約 10 nm であり、より好ましくは約 1 nm から約 6 nm であり、特に好ましくは 1 nm から約 4 nm である。リンカー分子が短すぎたり堅固すぎると、ドナー及びアクセプター分子成分は容易に一を変えることができない。リンカー成分が長すぎると、標的ペプチド成分は効率的に標的配列成分に結合できない。リンカー成分は好ましくはペプチド成分である。好ましいリンカー成分は、1 ～ 30 アミノ酸残基、好ましくは 1

～15 アミノ酸残基のペプチドである。リンカーの一例は、-Gly-Gly- リンカーである。

リンカー成分はフレキシブルなスペーサーアミノ酸配列を含んでもよい。リンカー成分については、例えば、Huston, J. S., 他, PNAS 85:5879-5883 (1988), Whitlow, M., 他, Protein Engineering 6:989-995 (1993), 及び Newton, D. L., 他, Biochemistry. 35:545-553 (1996) などに記載されている。

標的配列は、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させるものであればよく、例えば、酵素によって認識されて切断される配列でもよい。例えば、標的配列としてプロテアーゼの基質部位を使用することができる。プロテアーゼとしてカススペース3を用いる場合は、標的配列のアミノ酸配列として DEVD を使用することができる。

蛍光指示薬には局在化配列が含まれていてもよい。局在化配列により、指示薬は、好適な細胞内小器官標的シグナル又は局在化宿主蛋白質と融合することにより細胞内の特定の部位に運ばれる。局在化配列又はシグナル配列をコードするポリヌクレオチドを蛍光指示薬をコードするポリヌクレオチドの5'末端に連結又は融合することができ、これによりシグナルペプチドは生じる融合ポリヌクレオチド又はポリペプチドのアミノ末端に位置することができる。

真核細胞の場合、シグナルペプチドは融合ポリペプチドを小胞体を経由して輸送する機能を有すると考えられている。分泌蛋白質は次いでゴルジ体に運ばれ、分泌小胞及び細胞外空間、そして好ましくは外部環境に運ばれる。本発明で利用できるシグナルペプチドは、蛋白質分解酵素認識部位を含むプレプロペプチドでもよい。

局在化配列 は核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、又は局在化蛋白質でもよい。局在化配列は、例えば、"Protein Targeting", 35 章, Stryer, L., Biochemistry (4th ed.). W. H. Freeman, 1995 に記載されている標的配列でもよい。局在化配列は、局在化蛋白質でもよい。局在化配列の具体例としては、核を標的とする配列(KKKRK) (配列番号 32)、ミ

トコンドリアを標的とする配列(アミノ末端が MLRTSSLFTRRVQPSLFRNLRQLQST-) (配列番号 3 3)、小胞体を標的とする配列(KDEL (配列番号 3 4)、C-末端に) (シグナル配列は N 末端に存在する)、ペルオキシソームを標的とする配列(SKF (配列番号 3 5)、C-末端に)、細胞膜へのプレニレーション又は挿入を標的とする配列 ([CaaX] CAAX (配列番号 3 6), CC (配列番号 3 7), CXC (配列番号 3 8), 又は CCXX (配列番号 3 9)、C-末端に)、細胞膜の細胞質側を標的とする配列(SNAP-25 への融合)、又はゴルジ体を標的とする配列(furin への融合)などが挙げられる。

蛍光指示薬は組み換え DNA 技術により融合蛋白質として製造できる。蛍光蛋白質の組み換え生産は、蛋白質をコードする核酸の発現により行う。蛍光蛋白質をコードする核酸は、当業者に既知の方法で入手できる。例えば、蛋白質をコードする核酸は、オワンクラゲ緑色蛍光蛋白質の DNA 配列に基づいたプライマーを用いてオワンクラゲ由来 cDNA の PCR によって単離することができる。蛍光蛋白質の各種変異体は、蛍光蛋白質をコードする核酸の部位特異的変異誘発又はランダム変異誘発によって作製することができる。ランダム変異誘発は、0.1 mM MnCl を用いたりヌクレオチド濃度のバランスを崩して PCR を行うことにより行うことができる。

発現ベクターの構築及びトランスフェクションした細胞での遺伝子の発現は、当業者に公知の分子クローニング手法に従って行うことができる。これらの詳細は、Sambrook 他, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989)、並びに Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel 他, eds., (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., most recent Supplement)に記載されている。

ポリペプチドの発現をコードする配列で細胞をトランスフェクションするために使用する核酸は一般に、ポリペプチドの発現をコードするヌクレオチド配列に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクターである。ここで言う“ポリペプチドの発現をコードするヌクレオチド配列”とは、mRNA の転写及び翻訳により、

ポリペプチドを産生する配列を言う。例えば、イントロンを含む配列もこれに含まれる。ここで言う“発現調節配列”とは、それが作動的に連結している核酸の発現を調節する核酸配列を言う。発現調節配列が核酸配列の転写及び翻訳を調節および制御する際に、発現調節配列は核酸配列に作動的に連結している。発現調節配列は、好適なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、蛋白質コード遺伝子の前の開始コドン（即ち、ATG）、イントロンのスプライシングシグナル、及び停止コドンなどを含むことができる。

当業者に周知の方法を使用して、蛍光指示薬のコード配列と、適当な転写・翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、インビトロ組み換えDNA技術、合成技術、インビボ組み換え・遺伝組み換えなどが挙げられる（例えば、Maniatis, 他, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989 に記載の技術を参照）。組み換えDNAによる宿主細胞の形質転換は当業者に周知の慣用技術によって行うことができる。宿主細胞が大腸菌などの原核細胞である場合、DNAを取り込むことができるコンピテント細胞は、対数増殖期後に回収し、当業者に周知のCaCl₂法で処理した細胞を用いて作製することができる。あるいは、MgCl₂又はRbClを使用することもできる。形質転換は、宿主細胞のプロトプラストを作成後、またはエレクトロポレーションにより行うことができる。

宿主細胞が真核細胞である場合、リン酸カルシウム共沈殿法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム又はウイルスベクターに封入したプラスミドの挿入などのDNAトランスフェクション法を使用することができる。真核細胞は、本発明の融合ポリペプチドをコードするDNA配列と、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの適当な表現型をコードする外来DNA分子とを一緒にトランスフェクションすることができる。サルウイルス40（SV40）又はウシパピローマウイルスなどの真核ウイルスベクターを使用して、真核細胞を一過的に感染または形質転換して蛋白質を発現させることもできる（Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982

を参照)。好ましくは、真核細胞宿主を宿主細胞として使用する。

微生物又は真核細胞で発現させた本発明のポリペプチドの単離及び精製方法は任意の慣用方法を使用することができ、例えば、プレパラティブクロマトグラフィー分離及び免疫学的分離（モノクローナル又はポリクローナル抗体又は抗原を使用することを含むものなど）などが挙げられる。

蛍光指示薬をコードする配列を発現させるために、各種の宿主／発現ベクター系を使用することができる。例えば、蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、又はコスミド DNA 発現ベクターで形質転換した細菌；蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母；蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を感染させた植物細胞、又は蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ti プラスミド）で形質転換した植物細胞；蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；あるいは、蛍光指示薬をコードする配列を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）を感染させた動物細胞系などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

使用する宿主／ベクター系に応じて、適当な転写及び翻訳要素（例えば、構成的又は誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなど）を発現ベクター中で使用することができる（例えば、Bitter, 他, *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987 を参照）。例えば、細菌系にクローニングする場合、バクテリオファージ λ 、*plac*、*ptrp*、*ptac* (*ptrp-lac* ハイブリッドプロモーター) の *pL* などの誘導性プロモーターを使用することができる。哺乳動物細胞系にクローニングする場合、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、レトロウイルスロングターミナルリピート；アデノウイルス後期

プロモーター；ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーターなど）を使用することができる。組み換え DNA 又は合成技術で作製したプロモーターを使用して蛍光指示薬をコードする挿入配列を転写させることもできる。

細菌系では、発現する蛍光指示薬の意図する用途に応じて多数の発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、大量の蛍光指示薬を産生させる場合には、容易に精製される融合蛋白質産物の高量の発現を指令するベクターが望ましい。蛍光指示薬の回収を助ける切断部位を含むように加工したものが好ましい。

酵母では、構成的又は誘導性のプロモーターを含む多数のベクターを使用することができる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel, 他, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Grant, 他., Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp.516-544, 1987; Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986;並びに、Bitter, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684, 1987; 及び The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Strathern 他., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II, 1982 などを参照することができる。ADH 又は LEU2 などの構成的酵母プロモーターあるいは GAL などの誘導性プロモーターを使用することができる (Cloning in Yeast, Ch. 3, R. Rothstein In: DNA Cloning Vol.11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986)。あるいは、酵母の染色体への外来 DNA の組み込みを促進するベクターを使用することもできる。

植物の発現ベクターを使用する場合、蛍光指示薬をコードする配列の発現は、プロモーターにより促進することができる。例えば、CaMV の 35S RNA 及び 19S RNA プロモーターなどの ウイルスプロモーター (Brisson, 他, Nature 310:511-514, 1984)、又は TMV に対するコート蛋白質プロモーター (Takamatsu, 他, EMBO J. 6:307-311, 1987) を使用できる。あるいは、RUBISCO の小型サブユニット (Coruzzi,

他, 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, 他, Science 224:838-843, 1984)などの植物プロモーター、又はヒートショックプロモーター（例えば、大豆 hsp17.5-E 又は hsp17.3-B (Gurley, 他, Mol. Cell. Biol. 6:559-565, 1986)など）を使用してもよい。これらの構築物は、Ti プラスミド、Ri プラスミド、植物ウイルスベクター、直接 DNA 形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどによって植物に導入することができる。これらの技術については、例えば、Weissbach & Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463, 1988;及び Grierson & Corey, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9, 1988 などに記載されている。

昆虫系を使用して蛍光指示薬を発現することも可能である。例えば、オートグラフアカリフォルニア核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用して外来遺伝子を発現することができる。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞で生育する。蛍光指示薬をコードする配列をこのウイルスの非本質領域（例えば、多角体病遺伝子）中にクローニングし、AcNPV プロモーターの制御下に置く。蛍光指示薬をコードする配列を正しく挿入した場合、多角体病遺伝子是不活化し、未閉塞の組み換えウイルスが産生する。これらの組み換えウイルスを使用して *Spodoptera frugiperda* 細胞に感染させ、その細胞内で挿入した遺伝子を発現させることができる（例えば、Smith, 他, J. Virol. 46:584, 1983;及び米国特許第 4,215,051 号を参照）。

真核細胞系、好ましくは哺乳動物細胞の発現系を使用することにより、発現した哺乳動物の蛋白質の適切な翻訳後修飾を行うことが可能になる。一次転写物の適切なプロセッシング、グリコシル化、リン酸化、及び遺伝子産物の分泌のための細胞機構を有する真核細胞を、蛍光指示薬の発現のための宿主細胞として使用することが好ましい。そのような宿主細胞株としては、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、Jurkat、HEK-293、並びに WI38 などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

組み換えウイルス又はウイルス要素を利用して発現を指令する哺乳動物細胞系を構築することができる。例えば、アデノウイルス発現ベクターを使用する場合、蛍光指示薬をコードする配列をアデノウイルス転写／翻訳調節複合体（例えば、後期プロモーター及び3つのリーダー配列など）に連結することができる。このキメラ遺伝子をインビトロ又はインビボ組み換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非本質領域（例えば、E1 又は E3 領域）への挿入により感染宿主で生存可能で蛍光指示薬を発現することができる組み換えウイルスが得られる（例えば、Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3655-3659, 1984 を参照）。あるいは、ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーターを使用することができる（例えば、Mackett, 他, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7415-7419, 1982; Mackett, 他, *J. Virol.* 49: 857-864, 1984; Panicali, 他, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4927-4931, 1982 を参照）。染色体外要素として複製する能力を有するウシパピローマウイルスに基づくベクターを使用することも可能である（Sarver, 他, *Mol. Cell. Biol.* 1: 486, 1981）。この DNA をマウス細胞に導入した直後に、プラスミドは細胞当たり約 100～200 コピー複製する。挿入した cDNA の転写には、プラスミドが宿主の染色体に組み込まれることは必要ではなく、これにより高レベルの発現が生み出される。これらのベクターは、neo 遺伝子などの選択マーカーをプラスミド中に含めることによって安定した発現のために使用することができる。あるいは、レトロウイルスゲノムを改変して、宿主細胞内での蛍光指示薬遺伝子の発現を誘導及び指令することができるベクターとして使用することができる（Cone & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6349-6353, 1984）。高レベルの発現は、メタロチオニン IIA プロモーター及びヒートショックプロモーターなどの誘導性プロモーターを使用することによって達成することができる。

組み換え蛋白質の長期間の高収量の生産のためには、安定な発現が好ましい。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用する代わりに、宿主細胞は、適当な発現調節要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネー

ター、ポリアデニレーション部位など) および選択マーカーで調節された蛍光指示薬 cDNA で形質転換することができる。組み換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、細胞が染色体にプラスミドを安定に組み込み、成長してコロニーを形成し、これをクローニングして細胞株として樹立することができる。例えば、外来 DNA の導入後、組み換え細胞を富裕培地で 1～2 日間増殖させ、その後に選択培地に切り替えることができる。多数の選択系を使用することができるが、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (Wigler, 他, Cell, 11: 223, 1977)、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, 他, Cell, 22: 817, 1980) 遺伝子をそれぞれ、tk⁻, hgp⁺rt⁻ 又は ap⁺rt 細胞で使うことができる。また、代謝拮抗物質耐性を、メソトレキセートに対する耐性を付与する dhfr (Wigler, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567, 1980; O'Hare, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 1527, 1981)、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072, 1981)、アミノグルコシド G-418 に対する耐性を付与する neo (Colberre-Garapin, 他, J. Mol. Biol., 150:1, 1981)、及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する hyg⁺ro (Santerre, 他, Gene, 30: 147, 1984) 遺伝子の選択の基礎として使用することができる。

近年、さらに別の選択遺伝子が報告されている。例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを使用することを可能にする trpB、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを使用することを可能にする hisD (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8047, 1988)、並びに、オルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである 2- (ジフルオロメチル) -DL-オルニチンに対する耐性を付与する ODC (ornithine decarboxylase) (McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, ed., 1987) などが挙げられる。

本発明の蛍光指示薬ポリペプチドをコードする DNA 配列は、適当な宿主細胞

にDNA導入することによりインビトロで発現することができる。即ち、本発明の組み換え蛍光蛋白質は、大腸菌などの原核細胞、又は酵母や哺乳動物細胞などの真核細胞において核酸を発現することによって作製することができる。

構築物は、蛍光指示薬の単離を簡単にするためのタグを含んでいてもよい。例えば、6個のヒスチジン残基からなるポリヒスチジンタグを蛍光蛋白質のアミノ末端に付加することができる。ポリヒスチジンタグにより、ニッケルキレートクロマトグラフィーにより一回の操作で蛋白質を簡単に単離することが可能になる。

好ましくは、本発明の蛍光指示薬は、組み換えDNA技術で作製した融合蛋白質である。ここで、シングルポリペプチドは、ドナー成分、ペプチドリンカー成分及びアクセプター成分を含む。ドナー成分は、ポリペプチド中のアクセプター成分に対してアミノ末端側に位置することができる。そのような融合蛋白質は通常以下のような構造を有する：(アミノ末端) ドナー蛍光分子成分—ペプチドリンカー成分—アクセプター蛍光分子成分 (カルボキシ末端)。あるいは、ドナー成分は、融合蛋白質中のアクセプター成分に対してカルボキシ末端に位置してもよい。そのような融合蛋白質は通常以下の構造を有する：(アミノ末端) アクセプター蛍光分子成分—ペプチドリンカー成分—ドナー蛍光分子成分 (カルボキシ末端)。さらに、アミノ末端及び／又はカルボキシ末端に付加的なアミノ酸配列（例えば、ポリヒスチジンタグなど）を含む融合蛋白質も本発明に包含される。

組み換え核酸によってコードされる蛍光指示薬は、ドナー蛍光分子成分、アクセプター蛍光分子成分及びペプチドリンカー成分の発現をコードする配列を含む。各構成要素は、融合蛋白質への発現により、ドナー成分が励起する際にドナー及びアクセプター成分がFRETを示すように選択される。組み換え核酸は、組み換え核酸に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクター内に組み込むことができる。発現ベクターは、適当なプロモーター、複製配列、マーカーなどを含むことによって原核細胞または真核細胞で機能するように構成することができる。

発現ベクターは、組み換え核酸の発現のために宿主細胞にトランスフェクションすることができる。宿主細胞は、蛍光指示薬融合蛋白質を精製するために高レ

ベルの発現のために選択することができる。大腸菌 (*E. coli*) はこの目的に有用である。あるいは、宿主細胞は、その他の原核細胞でも真核細胞でもよい。リンカーペプチドは、プロテアーゼによって認識されるアミノ酸配列を含むように選択することができる。細胞は培養細胞でもインビボの細胞でもよい。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

(1) W-cameleon の遺伝子構築

pRSET_B/Venus (Nagai, T. 他 (2002) *Nature Biotechnology* 20, 87-90) を鋳型に、
5' -attggatcccatggtgagcaagggcgagg-3' (配列番号 40)、
5' -catgcatgcgggcggcggtcacgaactc-3' (配列番号 41) をプライマーに用いて PCR を行ない、PCR 産物を制限酵素 *Bam*HI と *Sph*I で切断した。pRSET_B/YC2.12 (Nagai, T. 他 (2002) *Nature Biotechnology* 20, 87-90) を *Bam*HI と *Sph*I で切断することにより ECFP 遺伝子を取り除き、そこに上記の制限酵素処理済 PCR 産物をライゲーションさせ、W-cameleon タンパク質を大腸菌内で発現させることが出来る pRSET_B/W-cameleon を得た。W-cameleon の構造を図 1 (下段) に示す。

(2) W-SCAT の遺伝子構築

pRSET_B/Venus (Nagai, T. 他 (2002) *Nature Biotechnology* 20, 87-90) を鋳型に、
5' -gctggtaccatggtgagcaagggcgagg-3' (配列番号 42)、
5' -gcagaattctcacttgtacagctcgtccatgcc-3' (配列番号 43) をプライマーに用いて PCR を行い、PCR 産物を制限酵素 *Kpn*I、*Eco*RI で切断後、pRSETB の同制限酵素サイトにライゲーションすることにより、pRSETB/Venus-KE を得た。
pRSET_B/Venus (Nagai, T. 他 (2002) *Nature Biotechnology* 20, 87-90) を鋳型に、
5' -attggatcccatggtgagcaagggcgagg-3' (配列番号 44)、
5' -gctggtaccatcgacctcatcagtgatcccggcggcggtcacgaa-3' (配列番号 45) をプライマーに用いて PCR を行ない、PCR 産物を制限酵素 *Bam*HI と *Kpn*I で切断した。

この制限酵素処理済 PCR 産物を pRSETB/Venus-KE の *Bam*HI、*Kpn*I サイトにライゲーションすることにより W-SCAT タンパク質を大腸菌内で発現させることが出来る pRSET_B/W-SCAT を得た。W-SCAT の構造を図 1（上段）に示す。

（３）タンパク質の発現、精製

pRSET_B/W-cameleon または pRSET_B/W-SCAT を用いて大腸菌を形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37℃、15 時間培養した。シングルコロニーをピックアップし、50 μ g/ml のアンピシリンを含む 20ml の LB 培地が入った試験管に接種し、200rpm、室温で 4 日間培養した。培養後遠心分離により大腸菌を回収し 10ml の PBS(-) に溶解した。フレンチプレスを用いて菌体を破碎後、遠心分離により不溶性画分を取り除いた。上清に 800 μ l の Ni-NTA agarose (QIAGEN) を加え、室温にて 1 時間転倒混和後、添付プロトコールに従って、タンパク質を精製した。

（４）蛍光異方性の測定

上記で得られた W-cameleon 溶液を 1ml の測定溶液 (50mM HEPES (pH7.5), 100 μ M EGTA または 50mM HEPES (pH7.5), 100 μ M EGTA, 1mM CaCl₂) に溶解した。希釈率は 1 万分の 1 とした。上記で得られた W-SCAT 溶液を 10 倍希釈したもの 2 μ l と active caspase3 (CPP32, MBL) 1Unit を反応用緩衝液 (20mM HEPES (pH7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM DTT, 10% sucrose) に加え 20 μ l とし、37℃で 2 時間反応させた。Active caspase3 を加えないものを対照に用いた。反応後 1ml PBS(-) を加えた。上記それぞれのタンパク質の蛍光異方性を Beacon (TAKARA) を用いて測定した。測定の結果を以下の表 2 に示す。以下の結果から、本発明の蛍光指示薬である W-cameleon および W-SCAT を用いることによって、試料中の分析物質を検出・測定できることが分かる。

表 2：蛍光異方性の測定結果

	入射光の偏光方向 と平行な蛍光成分	入射光の偏光方向と と垂直な蛍光成分	蛍光異方性 (m A)
W-SCAT3			
casp3 なし	2555.7	1362.7	225.8
casp3 あり	2712.5	1265.2	276.0
W-came			
Ca なし	688.47	321.5	275.6
Ca あり	631.42	312.0	254.4

注：表中の数字はPMT（光電子倍增感管）で測定したときの蛍光強度（相対的な値）を示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、リガンドに誘導された立体構造変化を FRET によりモニターすることができる。本発明の蛍光指示薬は、細胞又は生体への遺伝子導入により *in situ* で作製することができるため、大量の可溶性組み換え蛋白質を発現及び精製し、それをインビトロで精製及び標識し、細胞にマイクロインジェクションで戻す必要がない。また、本発明の蛍光指示薬は、細胞構造を標的とすることができる。

さらに、従来の FRET を利用した各種蛍光指示薬は異なる色（スペクトル）を有する蛍光物質を利用している方法では、1つの FRET 観測で広範囲の波長域を使用するため、他色の蛍光色素との同時観察が制限される。それに対し本発明では原理上1色しか用いないため、FRET 観測に用いる波長域を狭小化でき、従って多色のイメージングに適する。例えば、CFP、YFP、RFP それぞれを基に蛍光異方性解消による FRET イメージングを行なえば、1つの細胞の中で3つの事象を同時にモニターすることが可能となる。

請求の範囲

1. 分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列の N 末端側と C 末端側に実質的に同一の蛍光特性を有する蛍光分子成分を結合させた蛍光指示薬。

2. 分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列；
標的配列に共有的に結合したドナー蛍光分子成分；及び、
標的配列に共有的に結合したアクセプター蛍光分子成分；
を含む蛍光指示薬であって；

ドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子が実質的に同一の蛍光特性を有する分子であり、分析物質の結合により標的配列中に立体構造の変化が生じ、次いでドナー分子及びアクセプター分子成分の相対的位置又は方向に変化が生じ、ある偏光特性を有した照射光によって励起した場合に観察される蛍光の偏光特性が照射光のものと異なる傾向が強くなる（偏光解消）、請求項 1 に記載の蛍光指示薬。

3. 蛍光分子成分が蛍光蛋白質である、請求項 1 又は 2 に記載の蛍光指示薬。

4. 蛍光分子成分が黄色蛍光蛋白質またはその変異体である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の蛍光指示薬。

5. 蛍光分子成分が蛍光蛋白質 Venus である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の蛍光指示薬。

6. 蛍光指示薬がさらに標的ペプチド成分とリンカー成分を含み、分析物質の標的配列が標的ペプチド成分を結合するためのペプチド結合ドメインをさらに含み、

リンカー成分が分析物質の標的配列と標的ペプチド成分とを共有的に結合し、
標的配列と標的ペプチド成分がアクセプター蛍光分子成分又はドナー蛍光分子成分の何れかに共有的に結合し、

標的配列に結合した分析物質が標的ペプチド成分及びペプチド結合ドメインの相対的位置又は方向の変化を誘導し、次いでドナー分子及びアクセプター分子成

分の相対的位置又は方向に変化が生じ、これによりある偏光特性を有した照射光によって励起した場合に観察される蛍光の偏光特性が照射光のものと異なる傾向が強くなる（偏光解消）、請求項 1 から 5 の何れかに記載の蛍光指示薬。

7. 標的配列が、カルモジュリン、cGMP 依存性蛋白質キナーゼ、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体のリガンド結合ドメイン、蛋白質キナーゼ C、イノシトール-1, 4, 5-トリホスフェート受容体、又はレコベリンである、請求項 1 から 6 の何れかに記載の蛍光指示薬。

8. 分析物質の標的配列がカルモジュリンである、請求項 7 に記載の蛍光指示薬。

9. 標的ペプチド成分が、骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCKp)、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK)、カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII)、カルデスモン、カルスペルミン、ホスホフルクトキナーゼ、カルシネウリン、ホスホリラーゼキナーゼ、Ca²⁺ATP アーゼ、59 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、60 Kda ホスホジエステラーゼ (PDE)、ニトリックオキシドシンターゼ、I 型アデニリルシクラーゼ、Bordetella pertussis アデニリルシクラーゼ、ニューロモジュリン、スペクトリン、ミリストイル化アラニンリッチ C キナーゼ基質 (MARCKS)、MacMARCKS (F52)、b-Adducin、ヒートショック蛋白質 HSP90a、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテイン 160 (HIV-1 gp160)、ブラッシュボーダーミオシン重鎖-I (BBMHBI)、希ミオシン重鎖 (MHC)、マストパラン、メリチン、グルカゴン、セクレチン、血管作動性腸ペプチド (VIP)、ガストリン阻害ペプチド (GIP)、又はカルモジュリン結合ペプチド-2 (Model ペプチド CBP2) のカルモジュリン結合ドメインである、請求項 6 に記載の蛍光指示薬。

10. リンカー成分がペプチド成分である、請求項 6 に記載の蛍光指示薬。

11. リンカー成分が 1 から 30 アミノ酸残基である、請求項 10 に記載の蛍光指示薬。

12. 分析物質が作用して指示薬の立体構造を変化させる分析物質の標的配列が、酵素により切断されるアミノ酸配列である、請求項 1 から 5 の何れかに記

載の蛍光指示薬。

13. シングルポリペプチドである、請求項1から12の何れかに記載の蛍光指示薬。

14. さらに局在化配列を含む、請求項1から13の何れかに記載の蛍光指示薬。

15. 局在化配列が核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、ゴルジ体局在化配列、又は細胞膜局在化配列である、請求項1から14の何れかに記載の蛍光指示薬。

16. 試料中の分析物質を検出又は測定する方法であって、
(1)試料と請求項1から15の何れかに記載の蛍光指示薬とを接触させる工程；
(2)ドナー成分を励起させる工程；及び
(3)試料中の分析物質の濃度や活性に対応した試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を測定する工程；
を含む方法。

17. 試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を、偏光解消を測定することにより測定する、請求項16に記載の方法。

18. 蛍光異方性を求めることにより偏光解消を測定する、請求項17に記載の方法。

19. 試料が生細胞であり、接触工程が蛍光指示薬を細胞中に取り込ませることを含む、請求項16から18の何れかに記載の方法。

20. 細胞へ蛍光指示薬を取り込ませる工程が、蛍光指示薬の発現をコードする核酸配列に作動的に連結した発現調節配列を含む発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることを含む、請求項19に記載の方法。

21. 請求項1から15の何れかに記載の蛍光指示薬をコードする核酸。

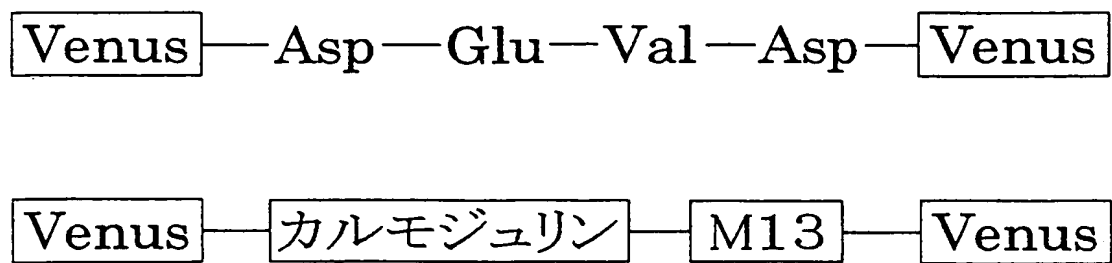
22. 請求項21に記載の核酸を含む発現ベクター。

23. 請求項21に記載の核酸又は請求項22に記載の発現ベクターを有する形質転換体。

要約書

本発明の目的は、ストークスシフトの小さい蛍光分子を利用して、ホモ FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）に基づいた蛍光指示薬を提供し、分子間相互作用の可視化システムを開発することである。本発明によれば、分析物質が結合又は作用して指示薬の立体構造を変化させる標的配列のN末端側とC末端側に実質的に同一の蛍光特性を有する蛍光分子成分を結合させた蛍光指示薬が提供される。

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Fluorescent indicator using FRET

<130> A31676A

<160> 45

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 1

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg

1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu

20 25

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> animal

<400> 2

Ala Arg Arg Lys Trp Gln Lys Thr Gly His Ala Val Arg Ala Ile Gly

1 5 10 15

Arg Leu Ser Ser

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> animal

<400> 3

Ala Arg Arg Lys Leu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Thr Met Leu Ala Thr

1 5 10 15

Arg Asn Phe Ser

20

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> animal

<400> 4

Gly Val Arg Asn Ile Lys Ser Met Trp Glu Lys Gly Asn Val Phe Ser

1 5 10 15

Ser

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> animal

<400> 5

Ala Arg Arg Lys Leu Lys Ala Ala Val Lys Ala Val Val Ala Ser Ser

1 5 10 15

Arg Leu Gly Ser

20

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 6

Phe Met Asn Asn Trp Glu Val Tyr Lys Leu Leu Ala His Ile Arg Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Lys Ser Gly Ser Tyr Thr Val
20 25

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 7

Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met
1 5 10 15

Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg
20

<210> 8

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 8

Leu Arg Arg Leu Ile Asp Ala Tyr Ala Phe Arg Ile Tyr Gly His Trp
1 5 10 15

Val Lys Lys Gly Gln Gln Gln Asn Arg Gly
20 25

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> animal

<400> 9

Arg Gly Lys Phe Lys Val Ile Cys Leu Thr Val Leu Ala Ser Val Arg

1 5 10 15

Ile Tyr Tyr Gln Tyr Arg Arg Val Lys Pro Gly

20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> animal

<400> 10

Leu Arg Arg Gly Gln Ile Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn Arg Ile Gln

1 5 10 15

Thr Gln Ile Lys Val Val Asn Ala Phe Ser Ser Ser

20 25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 11

Arg Arg Lys His Leu Gln Arg Pro Ile Phe Arg Leu Arg Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Lys

20

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 12

Thr Glu Lys Met Trp Gln Arg Leu Lys Gly Ile Leu Arg Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Lys

20

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> animal

<400> 13

Lys Arg Arg Ala Ile Gly Phe Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val Lys Phe

1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Met Gly Gln

20

<210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> animal

<400> 14

Ile Lys Pro Ala Lys Arg Met Lys Phe Lys Thr Val Cys Tyr Leu Leu

1 5 10 15

Val Gln Leu Met His Cys Arg Lys Met Phe Lys Ala

20

25

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> animal

<400> 15

Ala Cys Ile Asp Leu Leu Trp Lys Ile Ala Arg Ala Gly Ala Arg Ser
1 5 10 15

Ala Val Gly Thr Glu Ala
20

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> animal

<400> 16

Lys Ala His Lys Ala Ala Thr Lys Ile Gln Ala Ser Phe Arg Gly His
1 5 10 15

Ile Thr Arg Lys Lys Leu Lys Gly Glu Lys Lys
20 25

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 17

Lys Thr Ala Ser Pro Trp Lys Ser Ala Arg Leu Met Val His Thr Val
1 5 10 15

Ala Thr Phe Asn Ser Ile Lys Glu
20

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> animal

<400> 18

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser
1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys
20 25

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 19

Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly
1 5 10 15

Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys
20

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> animal

<400> 20

Lys Gln Gln Lys Glu Lys Thr Arg Trp Leu Asn Thr Pro Asn Thr Tyr
1 5 10 15

Leu Arg Val Asn Val Ala Asp Glu Val Gln Arg Asn Met Gly Ser
20 25 30

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 21

Lys Asp Gln Val Ala Asn Ser Ala Phe Gln Glu Arg Leu Arg Lys His

1 5 10 15

Gly Leu Glu Val Ile

20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> animal

<400> 22

Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Lys Arg Ile Val Glu

1 5 10 15

Leu Leu Gly Arg Arg

20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> animal

<400> 23

Gln Gln Leu Ala Thr Leu Ile Gln Lys Thr Tyr Arg Gly Trp Arg Cys

1 5 10 15

Arg Thr His Tyr Gln Leu Met

20

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> animal

<400> 24

Arg Ala Ala Cys Ile Arg Ile Gln Lys Thr Ile Arg Gly Trp Leu Leu

1 5 10 15

Arg Lys Arg Tyr Leu Cys Met Gln

20

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> animal

<400> 25

Ile Asn Leu Lys Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> animal

<400> 26

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu

1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

20 25

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> animal

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp

1 5 10 15

Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

30

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> animal

<400> 28

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Glu Leu Ser Arg Leu Arg Asp Ser

1

5

10

15

Ala Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Gly Leu Val

20

25

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> animal

<400> 29

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20

25

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> animal

<400> 20

Tyr Ala Asp Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ala Ile Met Asn Lys

1

5

10

15

Ile Arg Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Gln Gln Lys
20 25 30

Ser

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> animal

<400> 31

Lys Leu Trp Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu
1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 32

Lys Lys Lys Arg Lys

5

<210> 33

<211> 26

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<400> 33

Met Leu Arg Thr Ser Ser Leu Phe Thr Arg Arg Val Gln Pro Ser Leu
1 5 10 15

Phe Arg Asn Ile Leu Arg Leu Gln Ser Thr

20

25

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> eucaryotic cell
<400> 34
Lys Asp Glu Leu
<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> eucaryotic cell
<400> 35
Ser Lys Phe
<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> eucaryotic cell
<220>
<221> unsure
<222> 4
<223> unknown
<400> 36
Cys Ala Ala Xaa
<210> 37
<211> 2
<212> PRT
<213> eucaryotic cell
<400> 37

Cys Cys

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<220>

<221> unsure

<222> 2

<223> unknown

<400> 38

Cys Xaa Cys

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> eucaryotic cell

<220>

<221> unsure

<222> 3

<223> unknown

<220>

<221> unsure

<222> 4

<223> unknown

<400> 39

Cys Cys Xaa Xaa

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

attggatccc atggtgagca agggcgagg

29

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

catgcatgcg ggcgcggtc acgaactc

28

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gctggtacca tggtagagcaa gggcgagg

28

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

gcagaattct cacttgtaga gctcgtccat gcc 33

<210> 44

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

attggatccc atggtgagca agggcgagg 29

<210> 45

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

gctggtacca tcgacctcat cagtgatccc ggcggcggtc acgaa 45